

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

A3

(11)Publication number : 57-198097

(43)Date of publication of application : 04.12.1982

(51)Int.Cl.

C12P 7/42
C12R 1/225

(21)Application number : 56-084080

(71)Applicant : KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 01.06.1981

(72)Inventor : HAMAGUCHI SHIGEKI
OGURA MASAHIRO
HASEGAWA JUNZO
KAWARADA HAJIME
WATANABE KIYOSHI

(54) PREPARATION OF L(+)-MANDELIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To prepare the titled substance useful as a raw material of pharmaceuticals, etc., by treating benzoylformic acid with bacteria belonging to Lactobacillus genus or Pediococcus genus.

CONSTITUTION: Benzoylformic acid is treated with bacteria belonging to Lactobacillus genus or Pediococcus genus, e.g. Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus plantarum, Pediococcus parvulus, Pediococcus pentosaceus, etc. The treatment is carried out by culturing the bacteria in a medium containing benzoylformic acid, or treating the benzoylformic acid with cultured liquid of the bacteria, or treating the benzoylformic acid with the suspension of bacterial cells or treated bacterial cells obtained from the cultured liquid of the bacteria. The reaction is carried out at 3W9pH and 20W40° C to obtain L(+)-mandelic acid converted from benzoylformic acid.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57-198097

⑬ Int. Cl.³
C 12 P 7/42
C 12 R 1/225

識別記号

庁内整理番号
6760-4B
6760-4B

⑭ 公開 昭和57年(1982)12月4日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑮ L(+)-マンデル酸の製造方法

明石市大久保町高丘2丁目13-4

⑯ 特 願 昭56-84080

⑰ 出 願 昭56(1981)6月1日

⑱ 発 明 者 濱口茂樹

明石市大蔵谷字狩口143番地の7

⑲ 発 明 者 小倉正博

小野市天神町1192-9

⑳ 発 明 者 長谷川淳三

㉑ 発 明 者 川原田肇

加古川市平岡町新在家2183の4

㉒ 発 明 者 渡辺清

明石市松ヶ丘5丁目15の41

㉓ 出 願 人 鐘淵化学工業株式会社

大阪市北区中之島3丁目2番4号

㉔ 代 理 人 弁理士 浅野真一

明 細 書

1. 発明の名称 L(+)-マンデル酸の製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) ベンゾイルギ酸に、このものをL(+)-マンデル酸に変換する能力を有するラクトバチルス属又はペディオコッカス属に属する微生物を作用せしめ、生成したL(+)-マンデル酸を採取することを特徴とするL(+)-マンデル酸の製造方法。

(2) 微生物がラクトバチルス・ブルガリカス、ラクトバチルス・プランタルム、ラクトバチルス・ペントサス、ペディオコッカス・パルプルス又はペディオコッカス・ペントサセウスである特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

(3) ベンゾイルギ酸を添加した培地で微生物を培養することにより、微生物をベンゾイルギ酸に作用させる特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

(4) 微生物を栄養培地で培養して得た培養液を

ベンゾイルギ酸に作用させる特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

(5) 微生物を栄養培地で培養して得た培養液から微生物菌体を分離して、菌体懸濁液又は菌体処理物を調製し、それをベンゾイルギ酸に作用させる特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

(6) 微生物の培養及びベンゾイルギ酸との反応をPH 3.0~9.0の範囲で行なう特許請求の範囲第3項記載の製造方法。

(7) 微生物の培養をPH 3.0~9.0の範囲で行ない、培養液、菌体懸濁液或いは菌体処理物とベンゾイルギ酸との反応をPH 4.0~8.5の範囲で行なう特許請求の範囲第4項又は第5項記載の製造方法。

(8) 微生物の培養及びベンゾイルギ酸との反応を20~40℃の範囲で行なう特許請求の範囲第3項、第4項又は第5項記載の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、医薬品原料或いは安価な光学分割剤

として有用なL(+)-マンデル酸を微生物を利用して工業的に製造する方法に関するものである。

従来、マンデル酸の光学活性体を得る方法としてエフェドリン、シンコニン等の光学分割剤を用いる方法が知られている〔L. Gattermann and H. Wieland, "Die Praxis des Organischen Chemikers" 35 Aufl., S199, Walter de Gruyter (1958)〕。しかし、このような光学分割剤を用いる方法では、目的とする光学活性マンデル酸が最大50%の収率でしか得られず、また分割剤が高価である等、工業的方法として難点があった。一方、合成法としては、ベンゾイルギ酸⁽¹⁾やベンゾイルギ酸エステル⁽²⁾から不斉還元反応により光学活性なマンデル酸を得る方法が知られている〔⁽¹⁾D. Nasipuri and C. K. Ghosh; Journal of the Indian Chemical Society, 44 (6), 556-8, (1967), ⁽²⁾A. Ohno, M. Ikeguchi, T. Kimura and S. Oka; Journal of the American Chemical Society, 101, 7036-40, (1979)〕。

antarum) IFO 8070, ラクトバチルス・ペントサス (Lactobacillus pentosus) IFO 12011, ペディオコッカス・パルプルス (Pediococcus parvulus) IFO 12238, ペディオコッカス・ペントサセウス (Pediococcus pentosaceus) IFO 3891 が挙げられる(但し、IFO: 財団法人発酵研究所)。その培養には、通常これらの菌が資化しうる有機及び無機の炭素源、窒素源及びビタミン、ミネラル等を適宜配合したものを用い、PH 3.0~9.0, 温度20~40℃の範囲で1~7日間培養すれば良い。又、菌の種類によつては通気攪拌し、微生物の生育を促進させることもできる。一方、反応基質であるベンゾイルギ酸との不斉還元反応においては、培養の開始時に培地中に反応基質を添加し、前記培養条件と同じPH、温度範囲で1~7日間、培養と並行して不斉還元反応を行なう方法と、培養とベンゾイルギ酸との反応を分けて行なう方法、即ち前記培養条件で培養して得られた培養液、菌体懸濁液或いは菌体処理物と反応基質であるベン

しかし、これらの方法は光学純度或いは使用する不斉還元触媒のコストの点で問題がある。

本発明者らはかかる問題点を解決し、かつ工業的に有利に製造することを目的として鋭意研究を重ねた結果、微生物を利用してベンゾイルギ酸より不斉還元反応により、L(+)-マンデル酸を高収率で、かつ高純度で得る方法を見出した。微生物を利用してベンゾイルギ酸よりL(+)-マンデル酸を蓄積させたのは、これが最初である。

本発明は更に詳しくは、ベンゾイルギ酸に、このものをL(+)-マンデル酸に変換しうる能力を有するラクトバチルス属又はペディオコッカス属に属する微生物を作用せしめ、生成したL(+)-マンデル酸を採取することを特徴とするL(+)-マンデル酸の製造法に関するものである。

本発明に使用されるベンゾイルギ酸からL(+)-マンデル酸へ変換する代謝系をもつ微生物としては、例えば、ラクトバチルス・ブルガリカス (Lactobacillus bulgaricus) IFO 3538, ラクトバチルス・プランタルム (Lactobacillus pl-

ンゾイルギ酸をPH 4.0~8.5, 好ましくはPH6.0~8.0の範囲、温度20~40℃の範囲で1~7日間接触させて不斉還元反応を行なう方法があるが、後者の方が良好な結果を与える。ここでいう菌体懸濁液とは、培養して得られた菌体と培養液を一旦遠心分離して分け、更めて菌体を培養液又は上記の栄養液に懸濁させたものであり、一方菌体処理物とは、培養して得られた菌体を遠心分離により培養液と分離し、この菌体を適当な方法により処理したもので、例えば公知の方法によりアクリルアミドゲル担体等に固定化する方法が挙げられる。菌体処理物を用いる利点としては、ベンゾイルギ酸との反応を連続的に行なうことができる。

反応基質であるベンゾイルギ酸は反応液中での濃度は0.1%から10%程度の高濃度まで用いることができる。添加方法に関しては一括或いは分割添加どちらでも良い。乳酸菌では生成する乳酸により、PHが低下してくるので適当な中和剤で最適PHを保持するのが望ましい。又、好氣的反

応条件下では通常副生成物が多くなるので、嫌気ないしは酸素の制限条件下で反応した方が良い収率を与える。

不斉還元反応によつて生成したL(+)-マンデル酸を反応液から単離するには、一般的に分離精製方法を用いれば良い。例えば、反応液より遠心分離によつて菌体等の不溶性物質を除去したのち、反応液のPHを1.0に調整し、酢酸エチルで抽出する。これを低温、減圧下にて溶剤を除くとL(+)-マンデル酸の粗結晶物が得られ、更にこのものを少量のアセトンに溶解し、ヘキサン-アセトン混合溶剤で溶出するシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行なうことにより容易に他の不純物と分離することができる。

以下、実施例によつて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

実施例 1

下記の組成からなる栄養液体培地を調製し、三角フラスコに80mlずつ分注後、120℃、15

分殺菌した。

培地組成：グルコース2%，イーストエキス0.5%，ペプトン0.3%，肉エキス0.8%
(NH₄)₂PO₄ 0.2%，KH₂PO₄ 0.1%，PH 7.0

これとは別に同じ組成の培地にて、前培養をした表1に示す微生物の種菌液10mlを前記培養培地に接種し、33℃、24時間静置培養を行なつた。

各菌株夫々90ml培養液に、10%ベンゾイルギ酸ソーダ溶液(PH 7.0)を10ml添加した。これを200ml4頭フラスコに入れ、窒素気流下、攪拌、PHを7.0に調整しながら30℃で48時間反応させた。反応後、遠心分離して得た上清を硫酸でPH 1.0とし、酢酸エチル200mlで抽出した。減圧濃縮後、これをヘキサンで懸濁調製したシリカゲルカラムに負荷し、ヘキサン/アセトン(3:1)混液で溶出した。マンデル酸画分を集め、減圧下溶剤を除去すると無色のマンデル酸結晶が得られた。NMRスペクトル、IRスペクトル、マススペクトル及びシリカゲル薄層クロマトグラフィー(ベンゼン：アセトン=2:3)による

R_f 値は標準品と一致した。又、その旋光度を測定したところ、いずれも $[\alpha]_D^{25} = +137.6^\circ \sim +147.1^\circ$ (C, 1.0, エタノール)の範囲を示しL(+)-マンデル酸であることが確認された。

表 1

ベンゾイルギ酸1g添加

菌 株	マンデル酸 収 量 mg	$[\alpha]_D^{25}$ (C, 1.0, エタノール)
ラクトサルモネラ・フルガリカス IFO 3588	271	+ 137.6°
ラクトサルモネラ・ブランタム IFO 8070	584	+ 140.1°
ラクトサルモネラ・ベントサス IFO 12011	682	+ 143.2°
ペディオコッカス・パルガリス IFO 12288	798	+ 147.1°
ペディオコッカス・ベントサセウス IFO 8891	838	+ 139.7°

実施例 2

下記の組成からなる栄養液体培地を調製し、三角フラスコに80mlずつ分注後、120℃、15分殺菌した。

培地組成：グルコース2%，イーストエキス0.5%，ペプトン0.3%，肉エキス0.8%，
(NH₄)₂PO₄ 0.2%，KH₂PO₄ 0.1%，PH 7.0

これとは別に同じ組成の培地にて前培養をした表2に示す微生物の種菌液10mlを前記培養培地に接種し、更に10%ベンゾイルギ酸ソーダ溶液(PH 7.0)を10ml添加した。

これを200ml4頭フラスコに入れ、窒素気流下、攪拌、PHを7.0に調整しながら30℃で72時間反応させた。以下、実施例1と同様の操作で抽出精製を行ないマンデル酸結晶を得た。これらのNMRスペクトル、IRスペクトル、マススペクトル及びシリカゲル薄層クロマトグラフィー(ベンゼン：アセトン=2:3)によるR_f 値は標準品と一致した。又、その旋光度を測定したところ、いずれも $[\alpha]_D^{25} = +142.7^\circ \sim +144.0^\circ$

(C, 1.0, エタノール)の範囲を示しL(+)-マンデル酸であることが確認された。

表 2

ベンゾイルギ酸 1 g 添加

菌 株	マンデル酸 収量(mg)	$(\alpha)_D^{25}$ (C,1.0,エタノール)
ラクトサル・ベントサス IFO 12011	527	+ 142.7°
ペディオコッカス・ソレプルス IFO 12233	684	+ 144.0°

実施例 8

下記の組成からなる栄養液体培地を調製し、三角フラスコに500 mlずつ分注後、120℃、15分殺菌した。

培地組成：グルコース2%、イーストエキス0.5%、ペプトン0.8%、肉エキス0.8%
(NH₄)₂PO₄ 0.2%、KH₂PO₄ 0.1%、PH 7.0

これとは別に同じ組成の培地にて前培養をした
表 8 に示す微生物の種菌液10 mlを前配培養培地

表 8

2 g ベンゾイルギ酸添加

菌 株	マンデル酸 収量(mg)	$(\alpha)_D^{25}$ (C,1.0,エタノール)
ラクトサル・ベントサス IFO 12011	1523	+ 143.5°
ペディオコッカス・ソレプルス IFO 12233	1670	+ 146.2°

特開昭57-198097(4)
に接種し、38℃、24時間静置培養を行ない、得られた培養液を遠心分離により菌体を集め、更にこの培養上清液にて懸濁し80 mlとした。これに10%ベンゾイルギ酸ソーダ(PH 7.0)溶液20 ml添加した。これを200 ml 4頸フラスコに入れ、窒素気流下、攪拌、PHを7.0に調整しながら30℃で48時間反応させた。以下、実施例1と同様の操作で抽出精製を行ないマンデル酸結晶を得た。これらのNMRスペクトル、IRスペクトル、マスマスペクトル及びシリカゲル薄層クロマトグラフィー(ベンゼン：アセトン=2：8)によるR_f値は標準品と一致した。又、その旋光度を測定したところ、いずれも $(\alpha)_D^{25}$ = +143.5° ~ +146.2° (C, 1.0, エタノール)の範囲を示しL(+)-マンデル酸であることが確認された。